

Brevet de l'Union Européenne

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 décembre 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/001414 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
G01N 33/543, 33/58, 33/533

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JK, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/001884

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, Ug, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Date de dépôt international : 19 juin 2003 (19.06.2003)

français

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :
02/07545 19 juin 2002 (19.06.2002) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marca L'Etoile (FR).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera républiée si des modifications sont re-
ques

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: FLUORESCENT MAGNETIC NANOPARTICLES

A1

(54) Titre : NANOParticules magnétiques fluorescentes

(57) Abstract: The invention relates to particles having an average diameter of between 50 and 1000 nm, preferably between 100 and 500 nm, comprising an organic and/or inorganic nanosphere containing uniformly-distributed magnetisable inorganic nanoparticles. The inventive particles are characterised in that fluorescent nanoparticles comprising a polymer matrix containing distributed fluorescent crystals or molecules are immobilised on the surface of the nanosphere. The invention also relates to conjugates of said particles as well as to diagnostic, therapeutic or prophylactic compositions containing same.

(57) Abrégé : L'invention concerne des particules présentant un diamètre moyen compris entre 50 et 1000 nm, de préférence entre 100 et 500 nm, comprenant une nanosphère organique et/ou inorganique dans laquelle des nanoparticules inorganiques magnétisables sont distribuées de manière homogène, caractérisées en ce que des nanoparticules fluorescentes, comprenant une matrice polymère dans laquelle des molécules ou des cristaux fluorescents sont répartis, sont immobilisées en surface de la nanosphère. L'invention a également pour objet les conjugués de telles particules, ainsi que les compositions diagnostiques, thérapeutiques ou prophylactiques les contenant.

WO 2004/001414

NANOPARTICULES MAGNEQUES FLUORESCENTES

5 Le domaine technique de l'invention est celui des supports colloïdaux, utilisés notamment comme support solide pour le transport de molécules biologiques. Plus précisément, la présente invention concerne des particules magnétiques et fluorescentes d'un diamètre compris entre 50 et 1000 nm, les suspensions colloïdales de telles particules, ainsi que des compositions diagnostiques, thérapeutiques ou prophylactiques contenant de telles particules.

10 Les microsphères de type polymère présentent un intérêt comme support, vecteur ou véhicule dans les domaines de l'ingénierie biologique, du diagnostic et de la pharmacie. A cet effet, elles ont été utilisées dans le diagnostic médical comme support solide pour des molécules biologiques.

15 Par rapport aux supports solides traditionnels utilisés dans ces domaines, tels que les tubes, plaques, billes, les particules colloïdales présentent plusieurs avantages notamment parce qu'elles permettent de disposer d'une grande surface pour des interactions spécifiques et parce qu'elles sont facilement modifiables chimiquement pour introduire à leur surface des groupements fonctionnels susceptibles de réagir 20 avec d'autres molécules, par exemple des molécules biologiques telles que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des protéines, des polypeptides, des polynucléotides, des acides nucléiques, des fragments d'acides nucléiques, des enzymes ou des molécules chimiques telles que des catalyseurs, des médicaments, des molécules cages, des chélatants.

25 Parmi les particules colloïdales, les latex magnétiques ont suscité un grand intérêt dans le domaine analytique et sont utilisés par exemple comme moyen pour séparer et/ou détecter des analytes, tels que des antigènes, des anticorps, des molécules biochimiques, des acides nucléiques et autres. Les particules composites de type polymère/magnétique sont habituellement classées en trois catégories sur un 30 critère de taille : les petites particules ayant un diamètre inférieur à 50 nm, les grosses particules ayant un diamètre supérieur à 2 µm et les particules intermédiaires d'un diamètre compris entre 50 et 1000 nm.

Pour être considérées comme de bons candidats, en particulier pour une application diagnostique, ces particules doivent répondre à certains critères.

D'un point de vue morphologique, il est préférable qu'elles présentent une forme générale sphérique et que la charge magnétique soit répartie de façon relativement homogène dans la matrice polymère. Elles ne doivent pas s'agrérer de manière irréversible sous l'action d'un champ magnétique, ce qui signifie qu'elles puissent être redispersées facilement, rapidement et de manière réversible. De même, elles doivent présenter une densité relativement faible pour réduire le phénomène de sédimentation. Avantageusement, elles doivent présenter une distribution granulométrique étroite. On parle encore de particules monodisperses ou isodisperses. Ainsi, en raison de leur taille et de leur densité, les grosses particules magnétiques en suspension dans une phase liquide ont tendance à rapidement sédimerter. Par ailleurs, elles tendent à s'agrérer après avoir été soumises à un champ magnétique car elles sont susceptibles d'avoir été de ce fait magnétisées de manière rémanente. On parle d'aimantation rémanente. Elles ne constituent donc pas un bon candidat. A contrario, les petites particules magnétiques ont tendance à rester en suspension du fait de leur mouvement Brownien et sont difficilement attirées, voire pas du tout, par un aimant, en particulier si le champ magnétique appliqué est relativement faible. Elles ne sont donc pas bien appropriées pour les utilisations développées ci-dessus.

On retrouve dans la littérature différents types de particules. On peut citer ainsi les particules Dynal (nom commercial). Ces particules sont des microsphères constituées d'un cœur de polystyrène relativement poreux et d'oxydes de fer, les oxydes de fer ayant été déposés par imprégnation dans les pores disponibles à la surface du polystyrène, et d'une enveloppe de polymère qui encapsule les oxydes de fer des microsphères poreuses. Elles présentent un diamètre respectivement de 2,8 µm (particules M280) et de 4,5 µm (particules M450) et sont relativement uniformes en taille. Elles sont donc considérées comme des particules isodisperses mais en raison de leur taille élevée, un phénomène de sédimentation est rapidement observé. De plus, leur surface spécifique est faible.

La demande de brevet EP 0 390 634 décrit des microsphères composites magnétisables de polymère vinylaromatique réticulé hydrophobe d'un diamètre de

l'ordre de 50 à 10000 nm et comprenant un cœur solide constitué de particules magnétisables et une écorce constituée d'un copolymère hydrophobe dérivé d'au moins un monomère vinylaromatique hydrophobe et d'au moins un polymère émulsifiant polyéthyléniquement insaturé soluble dans le ou les monomères vinylaromatiques et susceptible de réticuler avec le ou lesdits monomères. Toutefois, si ces particules présentent l'avantage d'être de petite taille, elles présentent l'inconvénient de ne pas avoir une répartition uniforme de la charge magnétique qui est localisée à l'intérieur du cœur. De plus, le procédé décrit ne permet pas d'obtenir des particules homogènes en taille mais un ensemble de particules polydispersées qui doit être fractionné pour ne retenir que les particules de taille attendue. Enfin, du fait que les particules magnétisables à l'intérieur du cœur solide sont orientées de manière aléatoire et figées dans leur orientation, le moment magnétique résultant des microsphères composites correspond donc à la somme algébrique des moments des particules magnétisables. Une diminution du moment résultant lié à cette distribution 15 aléatoire des particules à l'intérieur du cœur solide est donc observée.

Il peut être également important que ces particules magnétiques soient marquées, notamment par fluorescence, et on retrouve dans l'état de la technique des procédés de fabrication de particules magnétiques fluorescentes.

Ainsi la demande de brevet internationale WO 91/09141 décrit un procédé de 20 fabrication de telles particules, lesdites particules comprenant un cœur polymère fluorescent, enrobé d'une couche oxyde de métal, l'ensemble étant enrobé par une couche polymère protectrice. Si ces particules présentent l'avantage d'être isodispersées, elles restent d'une taille importante (supérieure à 1 µm), ce qui favorise leur sédimentation et présentent une faible surface développée.

25 Le brevet US 4,724,094 décrit des particules magnétiques fluorescentes, obtenues par encapsulation de pigments fluorescents et de poudre magnétique par une couche de résine. Toutefois, la taille de ces particules ainsi obtenues reste importante (supérieure au micron). De plus, la présence d'oxyde de métal à proximité des groupements fluorescents peut affecter la fluorescence de la particule 30 obtenue.

L'art antérieur décrit également des particules d'un diamètre supérieur à 1 µm sur la surface desquelles des molécules fluorescentes comme la streptavidine ou la

biotine fluorescéine isothiocyanate (FITC) sont greffées chimiquement. Cependant, l'intensité de fluorescence de telles particules décroît très rapidement, dès les premières minutes d'illumination.

Il apparaît donc que les particules magnétiques et fluorescentes de l'art antérieur ne donnent pas entière satisfaction. Dans ce contexte, un des objectifs de la présente invention est de fournir de nouvelles particules qui soient à la fois magnétisables ou magnétiques et fluorescentes, qui présentent un diamètre moyen compris entre 50 et 1000 nm et qui soient capables d'émettre une intensité de fluorescence relativement stable dans le temps et pendant l'analyse.

Les particules selon l'invention présentent en suspension colloïdale une bonne séparation sous l'action d'un champ magnétique, elles sont stables, c'est à dire que les phénomènes d'agrégation ou de sédimentation sont réduits. De plus, elles sont obtenues directement sous la forme d'une dispersion isodisperse, c'est à dire homogènes en taille, de sorte que des étapes ultérieures de fractionnement ne sont pas nécessaires. Selon l'invention, une dispersion colloïdale est dite isodisperse en diamètre hydrodynamique si la distribution en taille mesurée par diffusion de lumière est très resserrée, c'est à dire que toutes les particules ont un diamètre moyen compris entre le diamètre moyen de la dispersion plus ou moins 10 nm. Plus la distribution en diamètre est resserrée plus le système est appelé isodisperse ou monodisperse.

Aussi, la présente invention a pour objet des particules présentant un diamètre moyen compris entre 50 et 1000 nm, de préférence entre 100 et 500 nm, comprenant une nanosphère organique et/ou inorganique dans laquelle des nanoparticules inorganiques magnétisables sont distribuées de manière homogène. Selon l'invention, des nanoparticules fluorescentes, comprenant une matrice polymère dans laquelle des molécules ou des cristaux fluorescents sont répartis, sont immobilisées en surface de la nanosphère.

Le diamètre hydrodynamique des particules est déterminé par diffusion de lumière en utilisant un appareillage Malvern Zetasizer 3000 HS, (Malvern Instrument, UK). La mesure est réalisée pour une dispersion infinitement diluée dans une solution NaCl 1 mM et à 20°C. Cette méthode permet de déterminer le diamètre hydrodynamique moyen des particules à plus ou moins 5 %, ce qui signifie que leur diamètre moyen en volume est défini à plus ou moins environ 5 % près.

Au sens de l'invention, le terme « immobilisé » désigne tout type d'interactions, telles que des interactions électrostatiques, complexations, interactions spécifiques, non spécifiques, réactions moléculaires, adsorption physique permettant l'immobilisation. L'immobilisation peut donc être effectuée par tout moyen.

Selon un mode de réalisation préféré, les particules selon l'invention présentent en surface des nanoparticules fluorescentes, des groupements fonctionnels réactifs tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine, époxyde, anhydride ou un récepteur susceptibles de réagir avec au moins un ligand. Dans ce cas, les particules selon l'invention présentent une bonne réactivité pour le greffage chimique ultérieur de biomolécules notamment.

L'invention a également pour objet des conjugués constitués d'une particule telle que définie ci-dessus sur laquelle au moins un ligand, choisi parmi un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique, un haptène et la biotine, est immunobilisé, en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

Un autre objet de l'invention consiste en un réactif pour diagnostic comprenant au moins un conjugué tel que défini ci-dessus, ainsi que les compositions diagnostiques comprenant un tel réactif.

L'invention a également pour objet des conjugués constitués d'une particule telle que définie ci-dessus sur laquelle au moins un ligand, choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs, est immobilisé en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

L'invention a également pour objet des conjugués constitués d'une particule telle que définie ci-dessus sur laquelle au moins un ligand, choisi parmi les substances médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes, les agents bloquant ou inhibant une activité protéique, est chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des

nanoparticules fluorescentes. Un autre objet de l'invention consiste en des compositions thérapeutiques ou prophylactiques comprenant un tel conjugué.

Les particules selon l'invention, en plus d'être magnétisables ou magnétiques et de présenter un diamètre moyen compris entre 50 et 1000 nm, ont l'avantage de présenter une visibilité et une résistance à la photoextinction améliorée. En effet, selon l'invention, les molécules fluorescentes, également nommées fluorophores, présentes dans les particules sont protégées par la matrice polymérique des nanoparticules fluorescentes, ce qui permet d'accroître leur stabilité face aux agressions du faisceau laser notamment, lors des mesures de fluorescence. Ces nanoparticules sont immobilisées, avantageusement greffées chimiquement, à la surface de la nanosphère.

De façon avantageuse, les nanoparticules fluorescentes ont un diamètre moyen compris entre 5 et 50 nm. De façon avantageuse, au moins six nanoparticules fluorescentes sont immobilisées en surface de la nanosphère et recouvrent, de préférence, jusqu'à au moins 54 % de la surface de la nanosphère.

La matrice polymère des nanoparticules fluorescentes est, par exemple, en un polymère hydrophobe choisi parmi les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques. On pourra utiliser toute molécule fluorescente, comme la fluorescéine éventuellement substituée, les dérivés de la fluorescéine, par exemple, la fluorescéine isothiocyanate, la 5-carboxy fluorèsceine, la 2',7'-disfluorofluoresceine (commercialisée sous le nom Orange Green), la bromométhyle-fluoresceine, ou encore la rhodamine, les dérivés de la rhodamine, le succinimidyl de l'acide carboxylique de la trifluoroacétamide (commercialisé sous le nom Rhodamine Green), le 3-acide carboxylique de diéthylaminocoumarine, l'acide acétique de l'hydroxy-méthylcoumarine, le méthacrylate de méthyl d'antracényle (monomère), le 3,8-diméthacryloyl de bromure d'éthidium (agent de réticulation), le diméthacrylate

de la fluorésceine (agent de réticulation), le méthacryloxyéthyl thiocarbamoyl de la rhodamine B (monomère), l'acrylate ou le méthacrylate de 2'-naphthyl (monomère), les dérivés du pyrènes, comme le 1-pyrényméthyl méthacrylate (monomère), le thodol et ses dérivés, ou Texas Red, les cristaux CdS et les « quantum dots », 5 nanocristaux fluorescents. On pourra notamment utiliser les particules commercialisées par les sociétés Prolabo ou Molecular Probes, contenant par exemple les groupements fluorescents suivants (excitation/émission) : fluorescent jaune-vert (505/515), fluorescent rouge (580/605), fluorescent bleu (365/415), fluorescent pourpre (625/645), fluorescent rouge foncé (660/680), fluorescent rouge 10 nil (535/575), fluorescent infrarouge (715/755), fluorescent orange (540/560), fluorescent rouge-orange (565/580), fluorescent rouge lointain (690/720), fluorescent bleu-vert (430/465), luminescent europium (365/610), luminescent platine (390/650).

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les nanoparticules fluorescences présentent des propriétés filmogènes, c'est à dire qu'elles sont 15 susceptibles de former un film venant entourer la nanosphère organique et/ou inorganique sur laquelle elles sont immunobilisées. La formation du film se fait par simple chauffage à une température entraînant le ramollissement voire la fusion de la matrice polymère des nanoparticules fluorescences.

Les nanoparticules inorganiques magnétisables sont à base d'oxydes 20 métalliques, tels que les oxydes de fer, la magnétite, les ferrites telles que les ferrites de manganèse, de nickel, de manganèse-zinc, les alliages de cobalt, de nickel, les oxydes de fer étant particulièrement préférés

Avantageusement, les matériaux inorganiques sont choisis parmi les oxydes métalliques magnétisables, préférentiellement les oxydes de fer.

25 La masse des nanoparticules inorganiques magnétisables représentent 5 à 95 %, de préférence 10 à 90 % et avantageusement 20 à 90 % de la masse totale de la particule composite, de préférence 25 à 85 %.

A l'intérieur des particules de l'invention, les nanoparticules inorganiques magnétisables sont avantageusement stabilisées par des agents de stabilisation 30 choisis parmi les chaînes polymère amphiphiles, les agents tensioactifs ioniques ou non ioniques, fonctionnels ou non fonctionnels, polymérisables ou non polymérisables. Les agents tensioactifs fonctionnels sont en particulier choisis parmi

les acides gras ou des dérivés d'acides gras, en particulier l'acide oléique ou ses dérivés, et les mélanges d'agents tensioactifs tels que définis précédemment.

Les nanosphères organiques et/ou inorganiques dans lesquelles les nanoparticules inorganiques magnétisables sont distribuées de manière homogène, et 5 sur lesquelles les nanoparticules fluorescentes sont greffées chimiquement peuvent, par exemple, être des nanosphères de type (I) comprenant :

10

- un cœur essentiellement liquide constitué d'une phase organique dans laquelle les nanoparticules magnétisables sont distribuées et stabilisées,
- une enveloppe entourant le cœur liquide, ladite enveloppe comprenant au moins un polymère hydrophile obtenu par polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble.

15

En particulier le monomère hydrosoluble est un *N*-alkylacrylamide, un *N,N*-diakylacrylamide et plus particulièrement le *N*-isopropylacrylamide (NIPAM), le *N*-méthylacrylamide, le *N*-éthylméthacrylamide, le *N-n*-propylacrylamide, le *N-n*-propylméthacrylamide, le *N*-isopropylméthacrylamide, le *N*-cyclopropylacrylamide, le *N,N*-diéthylacrylamide, le *N*-méthyl-*N*-isopropylacrylamide, le *N*-méthyl-*N-n*-acrylamide.

20

Des nanosphères de type (I) sont, par exemple, décrites dans FR 9914194 auquel l'homme du métier pourra se référer.

Selon un autre aspect de l'invention, on peut utiliser des nanosphères de type (II) comprenant une matrice en un polymère hydrophobe dans laquelle les nanoparticules inorganiques magnétisables sont distribuées, ces nanosphères étant par exemple décrites dans FR 9914195.

25

Le polymère hydrophobe de la nanosphère de type (II) est, par exemple, choisi parmi les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans 30 lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques, les composés

diéniques. Préférentiellement, le polymère est un polymère réticulé. Ceci est obtenu en ajoutant dans le ou les monomères une faible quantité (inférieure à 10 % en poids) de molécules ayant au moins deux doubles liaisons réactives, telles que le divinyl benzène, le méthacrylate de vinyle, le cyanurate de triallyle, le diacrylate de mono ou 5 de polyéthylèneglycol.

Selon un mode de réalisation préféré, la matrice en polymère hydrophobe de la nanosphère de type (II) est entourée d'une enveloppe à base d'un polymère hydrophile obtenu par polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble, semblable à celui utilisé dans les nanosphères de type (I) ou bien par un copolymère 10 amphiphile comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe au moins partiellement immobilisée dans ou sur le polymère hydrophobe. Ces dernières nanosphères comportant un copolymère amphiphile d'enveloppe sont nommées de type (III).

Par copolymère amphiphile, on entend un copolymère possédant une partie 15 hydrophobe et une partie hydrophile, étant entendu que la partie hydrophobe et/ou la partie hydrophile peuvent être un ensemble de sous-parties respectivement hydrophobes et/ou hydrophiles constitutives du copolymère amphiphile. Ainsi, un copolymère amphiphile de l'invention est notamment choisi parmi les copolymères en blocs, les copolymères séquencés, les polymères ramifiés dont le squelette est 20 hydrophobe ou hydrophile et les ramifications sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes, les polymères en peigne dont le squelette est hydrophobe ou hydrophile et les ramifications en peigne sont respectivement hydrophiles ou hydrophobes.

La partie hydrophile du copolymère amphiphile peut être ionique, anionique 25 ou cationique, ou non ionique ; elle comporte des groupements fonctionnels qui sont réactifs, directement ou indirectement.

Selon l'invention, la partie hydrophobe est au moins partiellement immobilisée sur ou dans la matrice polymère. L'immobilisation de cette partie hydrophobe est toujours au moins de nature physique, et plus précisément 30 mécanique, du type emprisonnement, et peut venir compléter une fixation préalable de la partie hydrophobe, de nature chimique ou physique comme une fixation par

adsorption, par exemple. Ainsi, une immobilisation peut résulter des événements suivants :

- la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est adsorbée à la surface de la matrice, puis définitivement immobilisée dans la matrice par le polymère hydrophobe ;
- ladite partie hydrophobe est solubilisée dans la phase organique, puis emprisonnée dans le polymère hydrophobe lors de la formation de la matrice ;
- ladite partie hydrophobe est uniquement emprisonnée mécaniquement lors de la formation de la matrice polymère.

10 Cette immobilisation conduit à des particules possédant une forte stabilité colloïdale, et notamment bien supérieure à celle des particules connues décrites précédemment.

Un copolymère amphiphile approprié comprend avantagusement :

- 15 - une partie hydrophobe choisie parmi les polystyrènes, les polyalkyles tels que le polyéthylène, les chaînes d'acides gras, et/ou
- une partie hydrophile choisie parmi les polyacides acryliques, les polysulfates, les polyamines, les polyamides, les polysaccharides, les polycaprolactones et les polylactides.

20 Les nanosphères (III) sont préparées selon un procédé de préparation des particules composites précitées qui permet d'obtenir directement des nanosphères de diamètre souhaité et isodisperses sans nécessiter d'étape de tri ou de fractionnement en fonction du diamètre.

25 Selon un premier procédé de l'invention, on obtient des nanosphères (III) pour lesquelles la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée dans la matrice polymère, comme suit :

- 30 (i) on dispose d'une émulsion magnétique de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules magnétisables dispersées dans une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

(ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ; et

(iii) on polymérisé lesdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

5 et, selon ce procédé, on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, avant l'étape (iii), c'est à dire avant ou après l'étape (ii).

Selon un second procédé de l'invention, on obtient des particules composites pour lesquelles la partie hydrophobe du copolymère amphiphile est au moins partiellement immobilisée sur la matrice polymère, comme suit :

10 (i) on dispose d'une émulsion de départ stable et isodisperse constituée de deux phases non miscibles, une phase A hydrophobe constituée de gouttelettes contenant des nanoparticules magnétisables dispersées dans une phase organique contenant un agent tensioactif ; et une phase B hydrophile dans laquelle la phase A est dispersée ;

15 (ii) on introduit dans la phase B des monomères hydrophobes et au moins un agent amorceur ;

(iii) on polymérisé une fraction desdits monomères hydrophobes à l'intérieur de la phase A,

20 et, selon ce procédé, on introduit en outre, dans la phase B, au moins un copolymère amphiphile, avant l'étape (iii) ou après l'étape (iii), puis, lors d'une étape (iv), on polymérisé la fraction restante des monomères hydrophobes à la surface de la matrice polymère. Quand le copolymère amphiphile est introduit avant l'étape (iii), il peut être introduit avant ou après l'étape (ii).

25 Pour obtenir les nanosphères (III), le polymère amphiphile est avantageusement choisi parmi ceux énoncés précédemment dans la description des particules composites.

Les monomères mis en œuvre doivent former des polymères hydrophobes. Ils sont insolubles dans la phase hydrophile et choisis parmi les monomères vinylaromatiques tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, 30 amino-méthylstyrène, vinyltoluène. Ils sont utilisés seuls ou en mélange ou bien encore en mélange avec d'autres monomères polymérisables insolubles dans l'eau tels que les acrylates, les méthacrylates d'alkyle, les esters d'acides éthyléniques et

d'alkyle, les acide méthacryliques, les dérivés styréniques, les acides éthyléniques, les composés diéniques.

Il est possible d'ajouter au monomère ou au mélange de monomères un agent de réticulation hydrophobe, par exemple un monomère réticulant de type 5 divinylbenzène, diméthacrylate, en particulier diméthacrylate de vinyle.

L'amorceur organosoluble est choisi parmi les amorceurs de type azobis, tels que les 2,2'-azobis (2,4'-diméthyl valéronitrile), 2,2'-azobis (4-méthoxy-2,4-diméthylvaléronitrile), 2,2'-azobis (2-cyclopropylpropionitrile), 2,2'-azobis (2-méthylpropionitrile), 2,2'-azobis (2-méthylbutyronitrile), 1,1'-azobis (cyclohexane-10-carbonitrile), 1-((1-cyano-1-méthyléthyl)azo) formamide, 2-phénylazo-4-méthoxy-2,4-diméthyl-valéronitrile, diméthyl 2,2'-azobis (2-méthylpropionate, 4,4'-azobis (4-acide cyanovalérique) et 2,2'-azobis (2-hydroxyméthyl)propionitrile). Si on choisit un amorceur hydrosoluble ou faiblement hydrosoluble, tels que les peroxydes, les hydroperoxydes et les persulfates, il engendre un début de polymérisation dans la 15 phase hydrophile qui se propage dans la phase hydrophobe. Les persulfates, en particulier le persulfate d'ammonium, le persulfate de sodium et le persulfate de potassium sont solubles en phase aqueuse. Sous l'action de la chaleur, ils se décomposent et génèrent des radicaux sulfate qui contribueront à charger la nanosphère composite. Le peroxyde d'hydrogène est soluble en phase aqueuse et 20 génère des radicaux hydroxyles non chargés. La décomposition des hydroperoxydes génère un hydroxyle et un radical oxygéné qui se partageront dans une des phases en fonction de la nature du peroxyde utilisé. De la nature cationique ou anionique de l'amorceur dépendra le caractère cationique ou anionique de la particule et du conjugué résultant de l'invention, en l'absence de monomère fonctionnel.

25 L'agent amorceur est introduit dans la phase hydrophile et pénètre dans la phase hydrophobe (a) soit simultanément à l'introduction des monomères hydrophobes (b), soit préalablement à l'étape d'introduction des monomères hydrophobes (c), soit postérieurement à l'étape d'introduction desdits monomères hydrophobes.

30 Dans un mode de réalisation préféré, l'étape (iii), et éventuellement l'étape (iv) de polymérisation sont effectuées par élévation de la température jusqu'à environ 60 à 90°C, en particulier à une température de 70°C, en présence de l'amorceur de

polymérisation, étant entendu que les conditions de la polymérisation seront déterminées par l'homme du métier en fonction de la nature de l'amorceur retenu, ou par photochimie à l'aide de rayonnements, par exemple, de rayonnements ultra violet ou d'un faisceau laser ou d'autres sources d'énergie.

5 La phase organique est une phase comprenant un hydrocarbure aliphatique ou cyclique choisi parmi les composés comprenant de 5 à 12 atomes de carbone, leurs isomères et leurs mélanges ou une phase comprenant tout ou partie d'un composé organique polymérisable par voie radicalaire. De préférence, l'hydrocarbure est choisi parmi le pentane, l'hexane, l'heptane, l'octane, le nonane, 10 le décane, le undécane et le dodécane, et le composé organique polymérisable par voie radicalaire est choisi parmi les monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux, étant entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier d'adapter les conditions de polymérisation en fonction 15 du choix du ou des hydrocarbure(s) retenu(s) et de la nature de l'amorceur choisi. En particulier, si la polymérisation est effectuée par élévation de la température ou engendre une élévation de température, le montage réactionnel devra être adapté aux solvants volatils, tels que le pentane.

De manière préférentielle la phase hydrophile est une phase aqueuse, telle 20 que de l'eau.

Dans des modes de réalisation préférentiels de la présente invention, la fonctionnalisation des particules peut être complétée par introduction dans la phase B et pénétration dans la phase A de groupements réactifs fonctionnels. Les groupements réactifs fonctionnels sont apportés par exemple par des monomères 25 faiblement hydrophiles susceptibles de polymériser avec les monomères hydrophobes de la matrice polymère. En particulier, les groupements réactifs fonctionnels sont apportés par des monomères hydrophiles choisis parmi les monomères des acides acryliques, méthacryliques, éthyléniques et sulfoniques, les monomères aminés, seuls ou en mélange, ou encore en mélange avec des monomères 30 hydrophobes ; étant entendu qu'il est à la portée de l'homme du métier de déterminer la composition du mélange. Les groupements fonctionnels permettent les réactions ultérieures de greffage des nanoparticules fluorescentes, mais apportent également la

stabilisation colloïdale nécessaire pour les applications ultérieures. Les groupements fonctionnels sont introduits dans la phase B et pénètrent à l'intérieur de la phase A (a) soit de manière simultanée à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii), (b) soit préalablement à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii), (c) soit postérieurement à la pénétration des monomères hydrophobes de l'étape (ii).

Dans un mode de réalisation particulier, et si souhaité, l'étape (iii) est suivie d'une étape d'évaporation partielle ou totale de la phase organique A avec formation de particules composites poreuses.

10 Les nanosphères (III) sont donc fonctionnalisées par la partie hydrophile du copolymère amphiphile, et peuvent également l'être par la présence, de groupements fonctionnels réactifs, apportés comme indiqué ci-dessus au cours du procédé de préparation.

Selon un autre mode de réalisation préféré, la matrice en polymère hydrophobe 15 de la nanosphère de type (II) est entourée d'une enveloppe à base d'au moins trois couches de polymères compatibles. Cette enveloppe comporte, de préférence, une première couche de polymère cationique, une deuxième couche de polymère anionique et une troisième couche de polymère cationique. Par polymère anionique, on entend un polymère fonctionnalisé, par exemple par des fonctions $-COOH$, 20 susceptibles de former un anion et par polymère cationique, on entend un polymère fonctionnalisé, par exemple par des fonctions $-NH_2$, susceptibles de former un anion. Ces dernières nanosphères comportant une enveloppe au moins tricouche sont nommées de type (IV). Elles sont préparées selon les méthodes de polymérisation bien connues de l'homme de l'art.

25 Dans tous les cas, et ce qu'on utilise des nanosphères (I), (II), (III) ou (IV), ces nanosphères sont fonctionnalisées en surface, de préférence, par des groupements choisis parmi les groupements carboxylique, amine primaire, thiol, hydroxyl, tosyl hydrazine, époxyde, anhydride, qui permettent le greffage des nanoparticules fluorescentes, ces groupements étant apportés soit par un traitement de la surface des 30 nanosphères, par exemple chimique par hydrolyse ou greffage de groupements fonctionnels, soit par utilisation de monomères ou de d'amorceurs fonctionnalisés, selon le cas, pendant la préparation des nanoparticules.

Les nanoparticules fluorescentes utilisées présentent en surface au moins une fonction susceptible de réagir chimiquement avec les fonctions ci-dessus mentionnées, pour permettre leur fixation. Ce greffage chimique se fait selon des méthodes bien connues de l'homme de l'art, par exemple par réaction d'une fonction amine primaire présente en surface de la nanosphère avec une fonction acide carboxylique, après activation de la fonction carboxylique, par exemple par du dicyclohexylcarbodiimide (CDI) et du *N*-hydroxysuccinimide (NHS), ou encore par réaction d'une fonction amine primaire avec une fonction aldéhyde.

De façon avantageuse, les nanosphères fluorescentes présentent en surface des groupements fonctionnels réactifs tels que des groupements carboxylique, amine primaire, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine, époxyde, anhydride ou un récepteur susceptibles de réagir avec au moins un ligand. Les particules fonctionnalisées ainsi formées seront susceptibles d'immobiliser un ligand, par exemple une molécule biologique, telle qu'un anticorps, un fragment d'anticorps, 10 une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, une sonde, une amorce, un fragment d'acide nucléique, des molécules chimiques, telles que des polymères chimiques, des substances médicamenteuses, des molécules cages, des agents chélatants, des catalyseurs, la biotine.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, les particules de l'invention comprennent également, outre les nanoparticules fluorescentes, des nanoparticules filmogènes immobilisées en surface de la nanosphère desdites particules.

Ces particules sur lesquelles sont immobilisées à la fois des nanoparticules fluorescentes et des nanoparticules filmogènes peuvent être préparées comme décrit précédemment, à ceci près qu'on ajoute les nanoparticules filmogènes en même temps que les nanoparticules fluorescentes. L'excès de nanoparticules filmogènes et fluorescentes est éliminé en présence d'un agent stabilisant. Les particules ainsi obtenues sont ensuite filmifiées comme décrit précédemment.

Des exemples de nanoparticules filmogènes sont décrits dans EP 644 205. 30 Le polymère constitutif de ces nanoparticules filmogènes présente de préférence une température de transition vitreuse comprise entre 10 et 16° C.

Ces nanoparticules filmogènes sont alors porteuses de groupements fonctionnels réactifs, tels que définis ci-dessus, susceptibles de réagir avec au moins un ligand. Ces groupements restent accessibles en surface après formation du film venant entourer la particule magnétique et emprisonnant les nanoparticules fluorescentes.

Les agents stabilisants sont largement connus de l'homme du métier et peuvent être, par exemple, des agents tensioactifs tels que des agents tensioactifs cationiques, anioniques et non ioniques, ou des polymères ou copolymères amphiphiles. Ces agents stabilisants sont emprisonnés lors de la filmification et peuvent participer à la fonctionnalisation de la particule pour le greffage ultérieur de ligands biologiques.

La présente invention a également pour objet les nanoparticules obtenues par filmification des nanoparticules filmogènes.

La présente invention a également pour objet les suspensions colloïdales en phase aqueuse des particules selon l'invention, en particulier les suspensions colloïdales isodispersées.

La présente invention a également pour objet les conjugués constitués d'une particule décrite ci-dessus, sur laquelle au moins un ligand choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs, est immobilisé, en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

Aussi, la présente invention a également pour objet des conjugués constitués par des particules composites de l'invention dont les groupements fonctionnels ont réagi, directement ou indirectement, avec au moins un ligand tel que défini ci-dessus, ainsi que leurs utilisations.

La présente invention a donc pour objet des conjugués constitués de particules — telles que définies ci-dessus sur lesquelles au moins un ligand choisi parmi un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique, un haptène et la biotine est immobilisé en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

A titre d'exemple, lesdits conjugués sont utilisés dans des tests immunologiques pour la détection et/ou la quantification de protéines, d'antigènes, d'anticorps dans un échantillon biologique ou dans des essais utilisant la technologie des sondes pour la détection et/ou la quantification d'un fragment d'acide nucléique 5 dans un échantillon biologique. L'utilisation de sondes pour la détection et/ou la quantification d'un acide nucléique dans un échantillon est bien connue de l'homme du métier et on peut citer à titre d'illustration la technique d'hybridation sandwich. De même, les conjugués de l'invention peuvent être utilisés comme « agents porteurs 10 d'amorces » pour une réaction d'amplification d'acides nucléiques dans un échantillon, par exemple par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou toute autre technique d'amplification appropriée, permettant ainsi la détection et/ou la quantification d'acides nucléiques dans l'échantillon biologique.

La présente invention a donc également pour objet un réactif et une composition diagnostique comprenant en outre lesdits conjugués et l'utilisation dudit 15 réactif dans un essai diagnostique.

Les conjugués trouvent également une application dans le domaine thérapeutique comme véhicule ou vecteur pour les substances médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes, les agents bloquant ou inhibant une activité protéique, et de ce fait ils peuvent être utilisés dans une composition 20 thérapeutique ou prophylactique.

Ainsi, les conjugués de l'invention sont susceptibles de véhiculer une substance médicamenteuse dans une composition thérapeutique ou prophylactique qui comprend ledit conjugué en association avec un adjuvant et/ou diluant et/ou excipient approprié et pharmaceutiquement acceptable, ladite substance 25 médicamenteuse étant capable d'être relarguée *in vivo*. Les définitions des excipients et adjuvants pharmaceutiquement acceptables sont décrits par exemple dans Remington's Pharmaceutical Sciences 16th ed., Mack Publishing Co.

Les conjugués de l'invention sont également susceptibles de véhiculer un 30 gène d'intérêt thérapeutique codant pour au moins une protéine d'intérêt ou un fragment d'une protéine d'intérêt, étant entendu que par protéine on entend à la fois une protéine dans sa définition la plus généralement utilisée et un anticorps. Bien entendu, un tel conjugué est incorporé dans une composition thérapeutique ou

prophylactique qui comprend également les éléments nécessaires à l'expression dudit gène d'intérêt thérapeutique.

Les conjugués de l'invention sont également utilisables, quand incorporés dans une composition thérapeutique ou prophylactique, pour le transfert *in vivo* de sondes ou oligonucléotides anti-sens. Les anti-sens sont capables d'interférer spécifiquement avec la synthèse d'une protéine cible d'intérêt, par inhibition de la formation et/ou du fonctionnement polysome selon le positionnement de l'ARNm dans la cible. Donc le choix fréquent de la séquence entourant le codon d'initiation de la traduction comme cible pour une inhibition par un oligonucléotide anti-sens vise à prévenir la formation du complexe d'initiation. D'autres mécanismes dans l'inhibition par oligonucléotides anti-sens impliquent une activation de la ribonucléase H qui digère les hybrides oligonucléotides anti-sens/ARNm ou une interférence au niveau de sites d'épissage par des oligonucléotides anti-sens dont la cible est un site d'épissage de l'ARNm. Les oligonucléotides anti-sens sont également complémentaires de séquences ADN et peuvent donc interférer au niveau de la transcription par la formation d'une triple hélice, l'oligonucléotide anti-sens s'appariant par des liaisons hydrogène dites de Hoogsteen au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN. Il est bien entendu que les oligonucléotides anti-sens peuvent être strictement complémentaires de la cible ADN ou ARN à laquelle ils doivent s'hybrider, mais aussi non strictement complémentaires à la condition qu'ils s'hybrident à la cible. De même, il peut s'agir d'oligonucléotides anti-sens non modifiés ou modifiés au niveau des liaisons inter-nucléotidiques. Toutes ces notions font partie des connaissances générales de l'homme de l'art.

La présente invention concerne donc une composition thérapeutique comprenant, entre autres, un conjugué vecteur d'un oligonucléotide anti-sens tel que définis ci-dessus.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif et n'ont aucun caractère limitatif. Ils permettront de mieux comprendre l'invention.

Le diamètre hydrodynamique moyens des particules est déterminé par diffusion de lumière en utilisant Malvern Zetasizer 3000 HS, (Malvern Instrument, UK). La mesure est réalisée pour une dispersion infiniment diluée dans une solution NaCl 1 mM et à 20°C.

Exemple 1 : Préparation de particules de latex magnétiques fluorescentes fonctionnalisées par des fonctions - COOH.

5 a) Préparation de nanosphères de latex magnétiques fonctionnalisées par des fonctions - NH₂.

L'élaboration de ces nanosphères de latex magnétiques est réalisée en deux étapes : une étape de polymérisation *in situ* et une étape de polymérisation par encapsulation.

10 i) **polymérisation *in situ***

Dans un réacteur de polymérisation, on introduit 40,4 ml, soit 2 g d'émulsion magnétique constituée de gouttelettes d'environ 220 nm de diamètre contenant des nanoparticules d'oxyde de fer (60 % en poids par rapport au poids de tensioactifs) dans de l'octane (11 mg d'octane /g d'émulsion solide) et un mélange de tensioactifs dodécylsulfate de sodium (SDS)) acide oléique, 15 lesdites gouttelettes étant stabilisées dans une solution de Triton ® X-405 à 2 g / l (émulsion préparée selon l'exemple 1i) de FR 99 14195). Le pH de l'émulsion est égal à 7,05. Cette émulsion est agitée sous azote à 200 rpm pendant 1 heure 30 minutes. 0,099 g de styrène et 0,0019 g de 2,2'-azobis(2,4-diméthylvaléronitrile) comme amorceur de la polymérisation sont ajoutés et le mélange réactionnel est agité à 250 rpm pendant 30 minutes à 20°C. La polymérisation est amorcée par chauffage à une température égale à 70°C pendant 150 minutes.

20 ii) **encapsulation**

Au mélange obtenu en (i), on ajoute 0,0087 g de 2,2'-azobisamidinopropane repris avec 1 ml d'eau milli-Q (eau stérile déminéralisée) bouillie et dégazée 25 puis, on additionne un mélange de 0,4648 g de *N*-isopropylacrylamide repris dans 1 ml d'eau milli-Q bouillie et dégazée, 0,0391 g de méthylène bisacrylamide repris dans 1 ml d'eau milli-Q bouillie et dégazée et 0,04 g d'aminooéthylméthacrylate, ce mélange étant introduit toutes les minutes, à raison de 1 ml/min. La polymérisation est réalisée pendant environ 18 heures. Les nanosphères présentent un diamètre moyen de 235 nm.

a2) Autre exemple de préparation de nanosphères de latex magnétiques fonctionnalisées par des fonctions -NH₂.

Des nanosphères de latex magnétiques sont préparées selon le même mode opératoire qu'au paragraphe (a1) mais 0,02 g d'aminoéthylméthacrylate sont utilisés 5 à l'étape (ii) à la place de 0,04 g. Dans ce cas, les nanosphères de latex magnétiques obtenues présentent un diamètre moyen de l'ordre de 230 nm.

b) Greffage chimique de nanoparticules fluorescentes de diamètre moyen de l'ordre de 20 nm.

10 On utilise des nanoparticules fluorescentes présentant des fonctions -COOH en surface et à base de polystyrène. 1 mg de nanosphères magnétiques obtenues à l'étape (a1) est mis en présence de 385 µl de tampon phosphate (10 mM, pH 6,8) - 1% Tween 20. A ce mélange, sont ajoutés 5 µl d'une solution de 1,3 dicyclohexylcarbodiimide (CDI, 10 µl/ml dans le DMSO), 50 µl de N-hydroxysuccinimide, (NHS, 130 mg/ml dans le DMSO) et 200 µg de nanoparticules fluorescentes carboxyliques (Molecular Probe, référence « Fluospheres carboxylate-modified microsphere », 20 nm, red fluorescent F-8786, 580/605). Après cette période d'incubation, le latex magnétique est lavé au moins trois fois avec de l'eau Milli-Q à 0,2% de Triton® X-405. Les particules obtenues présentent un diamètre moyen de l'ordre de 300 nm
15
20

Exemple 2 : Autre exemple de préparation de particules de latex magnétiques fluorescentes, fonctionnalisées par des fonctions -COOH.

25 Selon un mode opératoire analogue à l'exemple 1 (b), on réalise le couplage de particules fluorescentes fonctionnalisées avec des fonctions -COOH différentes (commercialisées par PROLABO sous la référence :Yellow-Green Estapor F-XC R97-06, diamètre 18nm, 505/515) sur des nanosphère obtenues aux exemples 1 (a1) et 1 (a2). Les quantités présentés dans le Tableau 1 ci-après sont utilisées.
30

Tableau 1

Exemple	2a	2b
Nanosphères magnétiques obtenues à l'exemple 1 (a1) à 8,9 %	0	22,5µl
Nanosphères magnétiques obtenues à l'exemple 1 (a2) à 6,84 %	29,5µl	0
Tampon Borate 100mM pH 9,3	789,5µl	796,5µl
Tween 20 1 %	25µl	25µl
CDI/DMSO (10µl/ml)	10µl	10
NHS/DMSO (500 mg/ml)	26µl	26
Latex fluorescent (COOH) à 1 %	120µl	120µl
Prolabo Estapor F-XC R97-06 (diam : 18 nm) Yellow-Green		
Incubation 3h à 37°C, 900 rpm		
3 lavages en eau milli-Q + 0,2 % Triton X 405		

5 Les particules obtenues à l'exemple 2a présentent un diamètre moyen de l'ordre de 226 nm.

Les particules obtenues à l'exemple 2b présentent un diamètre moyen de l'ordre de 258,9 nm.

10 **Exemple 3 : Préparation de particules de latex magnétiques fluorescents fonctionnalisés par des fonctions aldéhyde.**

32 µl d'une dispersion de nanosphères de latex magnétiques (6,2 g/100ml obtenue selon l'exemple 1 (a2)), 768 µl de tampon Borate (100 mM, pH 9,3) et 200 µl d'une solution de nanoparticules de latex fluorescentes présentant en surface des 15 fonctions aldéhyde (2 g/100ml, Molecular Probe, référence « Fluospheres carboxylate modified microsphere », Yellow-Green F8760 0,02µm, 505/515) sont incubées pendant une heure à 37°C sous agitation douce. Après cette période d'incubation, un volume de 50 µl de NaBH₄, 1M est ajouté et l'incubation est menée

pendant 1 heure à 37 °C. Le latex magnétique est lavé au moins trois fois avec de l'eau Milli-Q à 0,2% Tween-20. Les particules de latex magnétiques fluorescentes obtenues présentent un diamètre hydrodynamique moyen de l'ordre de 247 nm.

5 **Exemple 4 : Autre exemple de préparation de particules de latex magnétiques fluorescents fonctionnalisés par des fonctions aldéhyde.**

Selon un mode opératoire analogue, des particules de latex magnétiques fluorescents fonctionnalisés par des fonctions aldéhyde sont préparées à partir de 32 µl d'une dispersion de nanosphères de latex magnétique à un taux de solide de 10 5,1 % obtenue selon l'exemple 1 (a1). Les particules de latex magnétiques fluorescents obtenues présentent un diamètre hydrodynamique moyen de l'ordre de 259 nm.

15 **Exemple 5 : Autre exemple de préparation de particules de latex magnétiques fluorescents.**

a) Préparation de nanosphères de latex magnétiques cationiques « 3 couches » par adsorption de polycations et polyanions :

L'élaboration de ces nanosphères de latex magnétiques est réalisée en trois étapes 20 d'adsorption. Une première étape d'adsorption d'un polymère cationique : le PEI (polyéthylénimine), suivie d'une étape d'adsorption d'un polymère anionique : l'AMVE (anhydride maléique co-méthyl vinyl éther hydrolysé), puis la dernière couche est obtenue par une nouvelle étape d'adsorption de PEI.

25 i) **Obtention de la première couche : couche cationique.**

Dans un flacon en verre de 16 ml, on introduit 5 ml d'émulsion magnétique anionique (obtenu selon l'exemple 1i) de FR 99 14 195) à un taux de solide de 5%, soit 250 mg d'émulsion magnétique d'environ 200 nm de diamètre.

On ajoute 5 ml d'eau milli-Q et, après homogénéisation, le mélange est lavé par 30 séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 10 ml d'eau milli-Q. Après redispersion totale, l'émulsion est à

nouveau lavée par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 5 ml d'eau milli-Q.

Ces 5 ml d'émulsion magnétique lavée sont ajoutés rapidement, à l'aide d'une pipette de 5 ml, dans un flacon contenant 10 ml d'une solution aqueuse de PEI à 50 g/l. Après 15 minutes d'incubation sur un agitateur rotatif (roller), les particules magnétiques sont lavées par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 5 ml d'eau milli-Q. Après redispersion totale, 1 ml d'une solution aqueuse de PEI à 10 g/l sont ajoutés à la solution de nanosphères magnétiques. Après homogénéisation, l'émulsion est à nouveau lavée par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 5 ml d'eau milli-Q.

ii) **Obtention de la deuxième couche : couche anionique.**

Dans un réacteur de polymérisation magnétique, on introduit 20 ml de tampon acétate 50 mM à pH 5,8, 15 ml d'une solution d'AMVE à 11 g/l en tampon acétate 50 mM à pH 5,8 et 100 µl d'une solution de NaCl à 5M. Le mélange est homogénéisé pendant 5 minutes à une agitation de 250 rpm, puis la vitesse d'agitation est augmentée jusqu'à 520 rpm .

Dans une ampoule en verre de 50 ml, équipée d'un robinet réglable et fixée sur le couvercle du réacteur de polymérisation, on ajoute les 5 ml de la dispersion de nanosphères magnétiques cationiques obtenue à l'étape (i) et 35 ml de tampon acétate 50 mM à pH 5,8.

La dispersion de nanosphères magnétiques ainsi diluée au 1/8^e est ajoutée au goutte à goutte sur le mélange réactionnel contenu dans le réacteur (eau milli-Q, AMVE, NaCl), sous une agitation constante de 520 rpm. Il faut un minimum de 30 minutes pour que la totalité des nanosphères magnétiques soit ajouté au mélange réactionnel. Après ces 30 minutes, la vitesse d'agitation est diminuée à 300 rpm. Au bout d'un temps total de 45 minutes (30 minutes à 520 rpm puis 15 minutes à 300 rpm) les nanosphères magnétiques sont récupérées est lavées par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 10 ml d'eau milli-Q.

Ces nanosphères, redevenues anioniques, sont dispersées par ultrason pendant 10 minutes et filtrées sur voile de nylon.

iii) **Obtention de la troisième couche : couche cationique.**

5 5 ml d'émulsion magnétique anioniques « 2 couches » obtenue à l'étape ii) sont lavés et ajoutés rapidement, à l'aide d'une pipette de 5 ml, dans un flacon de 30 ml contenant 10 ml d'une solution aqueuse de PEI à 10 g/l. Après 15 minutes d'incubation sur un agitateur rotatif (roller), les particules magnétiques sont lavées par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 10 ml d'eau milli-Q. Après redispersion totale, les nanosphères magnétiques, redevenues cationiques, sont dispersées par ultrason pendant 10 minutes, puis sont filtrées sur voile de nylon. Le diamètre hydrodynamique moyen des nanosphères magnétiques obtenues est de l'ordre de 540 nm.

15 b) Obtention de particules magnétiques « 3 couches » fluorescentes :

De telles particules sont obtenues par deux techniques de greffage de nanophères fluorescentes possédant à leur surface des fonctions carboxyliques (-COOH) ou des fonctions aldéhydes (-CHO).

20 i) **Greffage chimique de nanosphères fluorescentes carboxyliques :**

On utilise des nanosphères fluorescentes à base de polystyrène et présentant des fonctions -COOH. 2 mg de nanosphères magnétiques « 3 couches » cationiques (à fonction amine), obtenues à l'étape (a-iii) et possédant un taux de solide de 1,51% (soit 132 µl), sont mises en présence de 607 µl de tampon borate 100 mM pH 9,3, de 25 µl de Triton X405 à 1%, de 10 µl de CDI/DMSO (10 µl/ml), de 26 µl de NHS/DMSO (500 mg/ml) et de 200 µl de nanosphères fluorescentes (-COOH) à 1 % (Prolabo Estapor F-xc R97-06, 18 nm, Yellow-Green). L'ensemble est incubé pendant 3 heures à 37°C et sous une agitation de 900 rpm. Puis les nanosphères magnétiques sont lavées trois fois par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 1 ml de Triton X405 à 0,2%. Le diamètre hydrodynamique moyen des particules obtenues est de l'ordre de 628,8 nm.

ii) Greffage chimique de nanosphères fluorescentes aldéhydes :

On utilise des nanosphères fluorescentes à base de polystyrènes est présentant des fonctions -CHO. 2 mg de nanosphères magnétiques « 3 couches » cationiques, obtenues à l'étape (a-iii) et possédant un taux de solide de 1,51% (soit 132 µl), 5 sont mises en présence de 668 µl de tampon borate 100 mM pH 9,3 et de 200 µl de nanosphères fluorescentes (-CHO) à 1 % (Molecular Probes 20 nm, 505/515 Yellow-Green). L'ensemble est incubé pendant 1heure à 37°C et sous une agitation de 900 rpm. Après 1 heure d'incubation, on ajoute 50 µl de NaBH₄ 1M et l'ensemble est incubé pendant 1heure à 37°C et 900 rpm. Puis, les nanosphères 10 magnétiques sont lavées trois fois par séparation magnétique, élimination du surnageant et reprise des nanosphères magnétiques dans 1 ml de Triton X405 à 0,2%. Le diamètre hydrodynamique moyen des particules obtenues est de l'ordre de 413,8 nm.

15 Exemple 6 : Effet du greffage fluorescent sur les propriétés magnétiques des latex magnétiques.

Un test de vitesse de séparation magnétique est réalisé afin de comparer les conséquences du greffage de nanoparticules fluorescentes sur la vitesse de séparation des nanosphères de latex magnétiques. Pour cela, une cuve jetable en polypropylène 20 de 4 ml est remplie avec 2 ml de solution de particules magnétiques à 25 µg/ml, et est placée dans un spectrophotomètre. Un aimant plat est disposé sous la cuve. Une mesure cinétique de la densité optique est réalisée à 500 nm pendant 20 minutes. Le Tableau 2 présente les résultats obtenus.

Tableau 2**Vitesse moyenne**

(en Abs/min.)	Sur 1 min.	Sur 2 min.
Nanosphères exemple 1 (a1)	0,267	0,184
Nanosphères exemple 1 (a2)	0,422	0,287
Particules magnétiques fluorescentes exemple 2a	0,322	0,205
Particules magnétiques fluorescentes exemple 2b	0,294	0,207

Comme présentées aux fig. 1 et 2 qui montrent l'évolution de l'ABS en fonction du temps t mesuré à 500 nm avec un spectrophotomètre UV-mc2 de Safas Monaco, les mesures cinétiques effectuées ne montrent pas de différences significatives dans la vitesse de séparation magnétique avant (exemples 1 (a1) et 1 (a2)) et après greffage de nanoparticules fluorescentes (exemples 2b et 2a).

Le protocole de greffage, tel que décrit dans les exemple 1 à 4 n'a pas d'influence notable sur les propriétés magnétiques des particules ainsi modifiées.

10 Exemple 7 : Résultat de photoextinction

Une étude visant à comparer la visibilité et la résistance à la photoextinction de particules magnétiques fluorescentes selon l'invention et de particules de l'art antérieur a été réalisé.

Des tests ont donc été réalisés d'une part avec les particules selon l'exemple 15 4 et d'autre part avec des nanosphères magnétiques immunicon commercialisées sous la référence « Streptavidin ferrofluid F-3106 » rendues fluorescentes par un greffage en surface de biotine FITC (Molecular Probes Fluorescein biotin B-1370), référencée 7. Dans les mêmes conditions d'illumination, la décroissance de la fluorescence pour ces différentes particules a été mesurée.

20 Protocole de mesure

Une goutte de 4 μ l de suspension de particules magnétiques et fluorescentes en tampon TE Triton 0,1 M NaCl est placée entre une lamelle en Si /SiO₂ et lamelle couvre-objet en verre, espacés de 0,27mm. Les particules sont ensuite confinées en un culot par un aimant « pyramide ». Enfin la décroissance de fluorescence est mesurée directement par un photomètre ANRITSU placé à la place d'un des 25 oculaires du microscope. Le culot est éclairé en continu et la première mesure est prise dès le début de l'illumination.

Résultats

Les résultats obtenus sous éclairage continu (avec un microscope ZEISS, objectif 30 10X, lampe HBO vapeur de mercure, photomètre Anritsu à l'oculaire) sont présentés à la fig.3 qui donne l'évolution de la luminosité relative (I_r) en fonction du temps (t en min) pour les particules 4 selon l'invention et les particules 7 de l'art antérieur.

On constate que la décroissance de la luminosité des particules Immunicon greffées avec de la biotine FITC est très rapide dès les premières minutes d'illumination. La luminosité, au-dessus du fond, n'est plus que de 30% de la luminosité initiale au bout de 5 minutes. Elle continue ensuite à décroître plus lentement et n'est plus que de 5 10% au bout de 15 minutes. En comparaison la luminosité des particules selon l'invention décroît régulièrement mais beaucoup plus lentement. Elle est de 88% de la valeur initiale au bout de 5 minutes, et elle est encore de plus de 55% après une heure d'éclairage permanent.

La photoextinction est due à une destruction irréversible des molécules de fluorophore soumises à des conditions d'éclairage intense. Cette destruction est très dépendante de l'environnement chimique des fluorophores et du temps. En particulier lorsque ceux-ci sont greffés sur une molécule biologique ou sur une surface, cette destruction ne se ramène pas à une simple constante de dissociation. De plus dans les conditions expérimentales, il existe dans le champ d'illumination et 15 de mesure, des molécules (ou des particules) de fluorophore libres en solution. Ces molécules contribuent pour une part au bruit de fond de fluorescence ; par diffusion latérale, les molécules détruites dans cette zone peuvent être remplacées par des molécules neuves, diminuant ainsi le taux de décroissance. Dans le cas des particules selon l'invention, les fluorophores ou molécules fluorescentes sont protégées de 20 l'environnement agressif.

Exemple 8 :

Soit 2mg (54 µl) de nanosphères magnétiques obtenues à l'exemple 1 (a1) de taux de solide (4,74%) dans une solution tampon Borate 100mM pH 9,3 contenant 746µl de nanolatex fluorescent (CHO) à 2% (Latex Aldehyde-sulfate Molecular Probes (0,02 µm) (505/515) Yellow-Green.). La dispersion est incubée pendant 1heure à 37°C et 900 rpm. Les particules magnétiques fluorescentes obtenues sont lavées puis redispersées dans le même tampon borate. A cette dispersion est ajouté 20 µl d'ODN (dT25) a une concentration de 673 nmoles/ml et la dispersion est incubée pendant 30 1heure à 37°C et 900rpm avant d'ajouter 50µl de NaBH₄ 1M dans l'eau. La dispersion fluorescente magnétique est lavée 3 fois avec l'eau milli-Q avant d'être reprises dans 1ml d'eau milli-Q contenant le tensioactif Triton X-405 à 0,2%.

Le greffage de l'ODN de capture et donc la formation d'un conjugué conforme à l'invention a été validé par un test ELOSA (de l'anglais "Enzyme-Linked OligoSorbent Assay", on pourra notamment se référer à « Preparation of Conjugates between Oligonucleotides and N-Vinylpyrrolidone/N-Acryloxsuccinimide Copolymers and Applications in Nucleic Acid Assays to Improve Sensitivity » Erout M.N., Troesch A., Pichot C. and Cros Ph. Bioconjugate Chemistry, 1996, 7(5) 568-575 et « Amino-containing cationic Latex-Oligodeoxyribonucleotide Conjugates : Application to Diagnostic test Sensitivity Enhancement » Th. Delair, F. Meunier, A. Elaïssari, M. H. Charles, C. Pichot. Colloid and Surfaces A., 1999, 153, 341-353). La cible est composée d'une partie dA et d'une séquence HIV. La révélation est réalisée en utilisant un oligonucléotide spécifique à la séquence HIV et portant l'HRP (« Horse Radish Peroxidase ») à son extrémité.

Après incubation, une analyse colorimétrique est réalisée. La densité optique (DO) de la coloration, proportionnelle à la quantité d'enzyme, et donc à la quantité de cibles hybridées, est mesurée à 492 nanomètres. On obtient pour le conjugué selon l'invention (particules magnétiques fluorescentes -CHO + dT25) une DO de 0,422 et pour le témoin négatif, une DO de 0,039.

Ce test met donc en évidence l'adsorption et/ou le couplage des oligonucléotides sur les particules magnétiques et fluorescentes de l'invention.

20

Exemple 9 :**I) Synthèse de particules magnétiques fluorescentes**

25 1) *Conversion de nanosphères magnétiques anioniques en nanosphères magnétiques cationiques*

30 2,5 ml d'eau milli-Q sont ajoutés à 0,83 ml d'émulsion magnétique (Référence AC7, diamètre de l'ordre de 285 nm, taux de solide de 18% ; fournie par la société Ademtech). Après homogénéisation, le surnageant est éliminé par séparation magnétique. Les gouttelettes d'émulsion magnétique sont reprises dans 5 ml d'eau milli-Q. Après homogénéisation puis séparation magnétique, 2,5 ml d'eau milli-Q sont ajoutés. Après redispersion, ces 2,5 ml d'émulsion magnétique lavée sont ajoutés à 5 ml de solution aqueuse de PEI à 50 g/l. Après 15 minutes d'agitation sur un

agitateur rotatif, les gouttelettes d'émulsion magnétique sont lavées par séparation magnétique, élimination du surnageant puis ajout de 2,5 ml d'eau milli-Q, 0,5 ml d'une solution aqueuse de PEI à 10 g/l est ensuite ajouté à l'émulsion magnétique. Après homogénéisation puis séparation magnétique, les gouttelettes d'émulsion magnétique sont lavées trois fois par 5 ml d'eau milli-Q. Finalement, les nanosphères magnétiques sont reprises dans 2,5 ml d'eau milli-Q.

10 *2) Hétérocoagulation*

0,73 ml de particules filmogènes dont le diamètre est de l'ordre de 47 nm (fournies par Rhodia, latex RHODOPAS ULTRAFINE PR 3500), 0,44 ml de particules fluorescentes (-COOH) (Molecular Probes F8787 «Fluospheres carboxylate modified microspheres» 0,02 µm Yellow Green Fluorescent (505/515) à 2 % de taux de solide), dont le diamètre est de l'ordre de 24 nm, ainsi que NaCl à 10^{-3} M (tel que le volume total soit de 20 ml) sont placés dans un réacteur en verre à double enveloppe de 100 ml. Le pH est au préalable ajusté à 7 avec HCl 1M. Les 2,5 ml d'émulsion de nanosphères magnétiques lavées obtenues dans l'étape précédente sont ajoutés à 15 ml de NaCl à 10^{-3} M et pH = 7, placés dans un pousse-seringue et additionnés au mélange particules filmogènes/particules fluorescentes, NaCl. La vitesse d'addition est d'environ 20 mL/h. Tout au long de la réaction, la température est maintenue à environ 2°C. La vitesse d'agitation est de 380 tours/min. Le réacteur est recouvert d'une feuille d'aluminium afin d'éviter toute perte de fluorescence.

25 *3) Filmification*

Avant de déclencher la filmification des nanoparticules filmogènes, il est nécessaire d'éliminer l'excès de nanoparticules puis de redisperser les hétérocoagulats dans une solution d'un copolymère amphiphile, le Coatex M883 (fourni par la société Coatex).
30 Les hétérocoagulats sont séparés du surnageant puis redispersés dans une solution de Coatex M883 (0,8 g/l de tampon borate à 10 mM). En pratique, un volume V d'émulsion magnétique est mélangé à un volume 2V de solution de Coatex. Après

séparation magnétique, les hétérocoagulats magnétiques sont redispersés dans un volume 2V de la solution de Coatex. Le diamètre hydrodynamique moyen des particules composites obtenues est de l'ordre de 306 nm. Elles sont enfin placées dans le réacteur préchauffé à 50°C. L'ensemble est chauffé durant 20h à 50°C sous 5 une agitation de 150 tours/min. Le diamètre hydrodynamique moyen des particules filmifiées obtenues est de l'ordre de 291 nm et le taux de solide final de l'émulsion de 0,53 %.

10 **II) Evaluation des performances biologiques des particules obtenues : test ELOSA**

Il faut tout d'abord synthétiser les conjugués particules magnétiques-ODN. Cette 15 étape de fonctionnalisation a été réalisée sur les particules magnétiques fluorescentes filmifiées obtenues précédemment, brutes ou lavées, en utilisant différents tampons.

1) *Préparation des conjugués particules magnétiques-ODN*

1 mg de particules sont aimantés (échantillon brut : Taux de solide = 0,53 % donc 20 190 µl ; échantillon lavé en tampon borate 1 mM : Taux de solide = 0,184 % donc 540 µl engagés). Les particules sont reprises dans 50 µl :

- échantillons bruts : de tampon phosphate 10 mM à pH = 6,8
de tampon phosphate 10 mM à pH = 6,8 et de Tween 20 à 0,01%

- échantillons lavés trois fois en tampon borate 1 mM : de tampon borate 1 mM à pH 25 = 9,1

30 µl d'EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) à 10 mg/ml du tampon approprié sont ajoutés au mélange précédent, puis la solution est complétée à 100 µl. 30 µg de streptavidine (6 µl à 5 mg/ml du tampon approprié) sont ajoutées au 30 mélange précédent (streptavidine dans tampon phosphate 10 mM seul pour les 2 essais en tampon phosphate, dans tampon borate 1 mM pour l'essai en tampon borate). Une première incubation de 1h à 37°C et 1000 tours/min est réalisée. Puis 100 µl de tampon de blocage (PBS (solution tampon phosphate)/ éthanolamine

- 40 mM / triton X100 à 0,05% / BSA (sérum d'albumine bovin) à 0,1%) sont ajoutés. Une nouvelle incubation de 30 min à 37°C et 1000 tours/min est réalisée. Le mélange est ensuite placé sous aimantation et, après séparation magnétique, repris en tampon PBS / Tween 20 à 0,1% / BSA à 0,1% (2 fois 100 µl). Finalement, les particules sont 5 reprises dans 100 µl de ce même tampon. Le taux de solide est alors de l'ordre de 1%.
2. 10^{15} copies d'oligonucléotide biotinylé (10 µl de dT25 6627) sont ajoutés. Puis une incubation de 30 min à 37°C et 1000 tours/min est réalisée. Après aimantation, les particules sont reprises en tampon PEG (2 fois 100 µl) et placées sous incubation 10 durant 15 min à 37°C et 1000 tours/min.

2) Test ELOSA

2 µl de conjugués à 1% (soit 20 µg de particules) sont dilués dans 50 µl de tampon 15 PEG. Puis 10^{11} copies de C-det HIV dA (6384, ODN cible) (2,8 µl à 1/1000) et 5. 10^{11} copies de det HIV (6359B, ODN de détection) (1,5 µl à 1/100) sont ajoutés au mélange précédent. Après une incubation de 30 min à 37°C et 1000 tours/min, les particules sont placées sous aimantation puis reprises en tampon PEG (3 fois 50 µl). 20 50 µl d'OPD à 2 mg/ml dans l'eau oxygénée (bioMérieux, référence 07645A) sont ajoutés au mélange. Après trois minutes, la réaction de coloration est bloquée par addition de 50 µl de H₂SO₄ à 1N. La lecture de densité optique à 492 nm de 100 µl du surnageant obtenu après aimantation permet d'estimer l'efficacité de capture de la cible, par comparaison avec un test "blanc" qui ne contient pas l'ODN cible. Les meilleurs résultats sont obtenus pour les essais de greffage de la streptavidine 25 conduits en tampon borate sur des échantillons lavés au préalable en tampon borate.

Tampons	Densité optique du test "blanc"	Densité optique en présence de la cible
Phosphate	0,01	$2,37 \pm 0,07$
Phosphate / Tween	0,01	$2,74 \pm 0,33$
Borate	0,03	$3,46 \pm 0,03$

REVENDICATIONS

- 1 - Particules présentant un diamètre moyen compris entre 50 et 1000 nm, de préférence entre 100 et 500 nm, comprenant une nanosphère organique et/ou inorganique dans laquelle des nanoparticules inorganiques magnétisables sont 5 distribuées de manière homogène, caractérisées en ce que des nanoparticules fluorescentes, comprenant une matrice polymère dans laquelle des molécules ou des cristaux fluorescents sont répartis, sont immobilisées en surface de la nanosphère.
- 2 - Particules selon la revendication 1, caractérisées en ce que les nanoparticules fluorescentes ont un diamètre moyen compris entre 5 et 50 nm.
- 10 3 - Particules selon la revendication 1 ou 2 caractérisées en ce que la matrice polymère des nanoparticules fluorescentes est en un polymère hydrophobe choisi parmi les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels 15 que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques.
- 4 - Particules selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisées en ce que les 20 molécules fluorescentes sont choisis parmi : la fluorescéine éventuellement substituée, les dérivés de la fluorescéine, par exemple, la fluorescéine isothiocyanate, la 5-carboxy fluorésceine, la 2',7'-difluorofluorésceine, la bromométhyle-fluorescéine, ou encore la rhodamine, les dérivés de la rhodamine, le succinimidyl de l'acide carboxylique de la trifluoroacétamide, le 3-acide carboxylique de diéthylaminocoumarine, l'acide acétique de l'hydroxy-méthylcoumarine, le 25 méthacrylate de méthyl d'antracényl, le 3,8-diméthacryloyl de bromure d'ethidium, le diméthacrylate de la fluorésceine, le méthacryloxyéthyl thiocabamoyl de la rhodamine B, l'acrylate ou le méthacrylate de 2'-naphthyl, les dérivés du pyrènes, comme le 1-pyrényméthyl méthacrylate, le thodol et ses dérivés.
- 30 5 - Particules selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisées en ce qu'au moins six nanoparticules fluorescentes sont immobilisées en surface de la nanosphère et recouvrent, de préférence, jusqu'à au moins 54 % de la surface de la nanosphère.

6 - Particules selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que la nanosphère comprend :

- un cœur essentiellement liquide constitué d'une phase organique dans laquelle les nanoparticules magnétisables sont distribuées et stabilisées,
- une enveloppe entourant le cœur liquide, ladite enveloppe comprenant au moins un polymère hydrophile obtenu par polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble.

5

7 - Particules selon la revendication 6 caractérisées en ce que les nanoparticules inorganiques magnétisables sont stabilisées par des polymères, des agents ioniques, des agents tensioactifs, des acides gras ou des dérivés d'acides gras, seuls ou mélangés.

10

8 - Particules selon la revendication 7 caractérisées en ce que les nanoparticules inorganiques magnétisables sont stabilisées par du dodécylsulfate de sodium ou bien par un mélange dodécylsulfate de sodium, acide oléique.

15

9 - Particules selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisées en ce que la nanosphère comprend une matrice en un polymère hydrophobe dans laquelle les nanoparticules inorganiques magnétisables sont distribuées.

20

10 - Particules selon la revendication 9 caractérisées en ce que le polymère hydrophobe de la nanosphère est choisi parmi les homopolymères de monomères vinylaromatiques insolubles dans l'eau, tels que styrène, méthylstyrène, éthylstyrène, tertio-butyl-styrène, vinyltoluène, ainsi que les copolymères de ces monomères entre eux et/ou avec d'autres comonomères, tels que les acrylates d'alkyle et les méthacrylates d'alkyle dans lesquels le groupement alkyle comprend de 3 à 10 atomes de carbone, les esters d'acides éthyléniques possédant 4 ou 5 atomes de carbone et d'alkyle possédant 1 à 8 atomes de carbone, les acides méthacryliques, les dérivés styréniques.

25

25

11 - Particules selon la revendication 9 ou 10 caractérisées en ce que la matrice en polymère hydrophobe est entourée d'une enveloppe à base d'un polymère hydrophile obtenu par polymérisation d'au moins un monomère hydrosoluble.

30

12 - Particules selon l'une des revendications 9 à 11 caractérisées en ce que la matrice en polymère hydrophobe de la nanosphère est entourée par un copolymère

amphiphile comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe au moins partiellement immobilisée dans ou sur le polymère hydrophobe.

13 - Particules selon la revendication 12 caractérisées en ce que la partie hydrophobe du polymère amphiphile est choisie parmi les polystyrènes, les polyalkyles tels que le polyéthylène, les chaînes d'acides gras.

14 - Particules selon la revendication 12 ou 13 caractérisées en ce que la partie hydrophile du copolymère est choisie parmi les polyacides acryliques, les polysulfates, les polyamines, les polyamides, les polysaccharides, les polycaprolactones et les polylactides.

15 - Particules selon l'une des revendications 12 à 14 caractérisées en ce que le copolymère amphiphile est choisi parmi les polymères en bloc, les polymères ramifiés, les polymères en peigne.

16 - Particules selon la revendication 9 ou 10 caractérisées en ce que la matrice en polymère hydrophobe est entourée d'une enveloppe à base de trois couches de polymères compatibles.

17 - Particules selon la revendication 16 caractérisées en ce que l'enveloppe comporte une première couche de polymère cationique, une deuxième couche de polymère anionique et une troisième couche de polymère cationique.

18 - Particules selon l'une des revendications précédentes caractérisées en ce que les nanoparticules inorganiques magnétisables sont à base d'oxydes de fer, magnétite, hématite, ferrites telles que les ferites de manganèse, nickel manganèse-zinc, ou bien les alliages de cobalt ou de nickel.

19 - Particules selon l'une des revendications précédentes caractérisées en ce qu'elles présentent en surface des nanoparticules fluorescentes des groupements fonctionnels réactifs tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine, époxide, anhydride ou un récepteur susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

20 - Particules selon les revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles comprennent également des nanoparticules filmogènes immobilisées en surface de la nanosphère.

21 - Particules obtenues à partir des particules selon la revendication 20, par filmification des nanoparticules filmogènes.

22 - Particules selon la revendication 20 ou 21, caractérisées en ce qu'elles présentent en surface des groupements fonctionnels réactifs tels que des groupements carboxylique, amine, thiol, aldéhyde, hydroxyl, tosyl, hydrazine, époxyde, anhydride ou un récepteur susceptibles de réagir avec au moins un ligand.

5 23 - Suspension colloïdale de particules selon les revendications précédentes en phase aqueuse.

24 - Suspension de particules selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'elle est isodisperse.

10 25 - Conjugué constitué d'une particule selon la revendication 19 ou 22 sur laquelle au moins un ligand choisi parmi un anticorps, un fragment d'anticorps, une protéine, un polypeptide, une enzyme, un polynucléotide, un fragment d'acide nucléique, un haptène et la biotine est immobilisé, en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

15 26 - Réactif pour diagnostic comprenant au moins un conjugué selon la revendication 25.

27 - Composition diagnostique comprenant un réactif selon la revendication 26.

20 28 - Conjugué constitué d'une particule selon la revendication 19 ou 22, sur laquelle au moins un ligand choisi parmi les molécules cages, les agents chélatants et les catalyseurs est immobilisé, en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

25 29 - Conjugué d'une particule selon la revendication 19 ou 22, sur laquelle au moins un ligand choisi parmi les substances médicamenteuses, les sondes anti-sens, les agents réparateurs de gènes, les agents bloquant ou inhibant une activité protéique, est immobilisé, en particulier chimiquement greffé par réaction avec l'un des groupements fonctionnels réactifs présents en surface des nanoparticules fluorescentes.

30 30 - Composition thérapeutique ou prophylactique comprenant un conjugué selon la revendication 29.

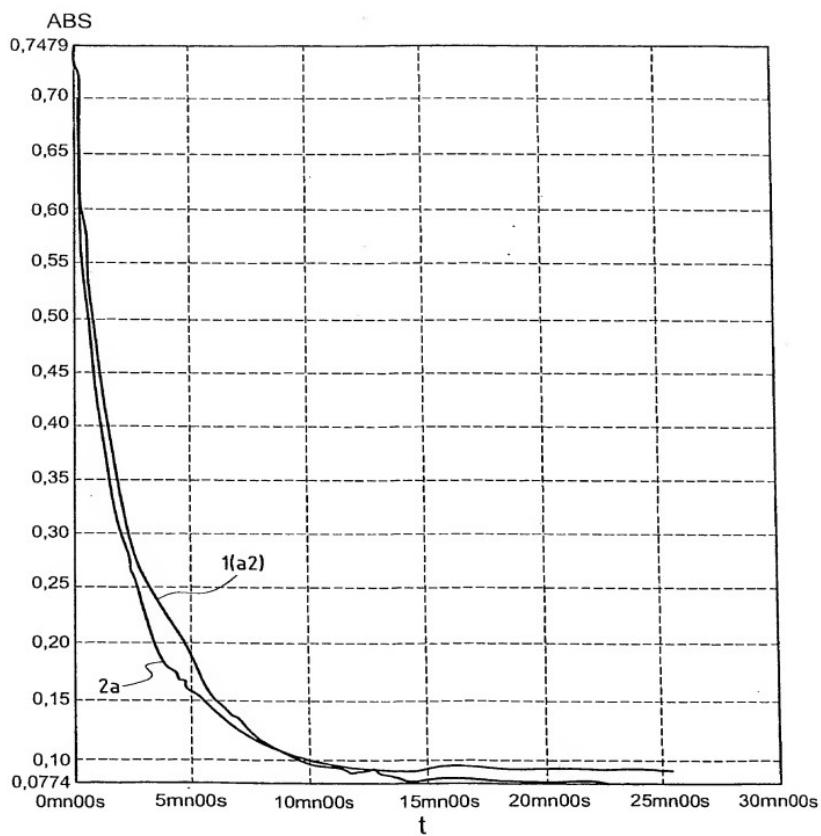


FIG.1

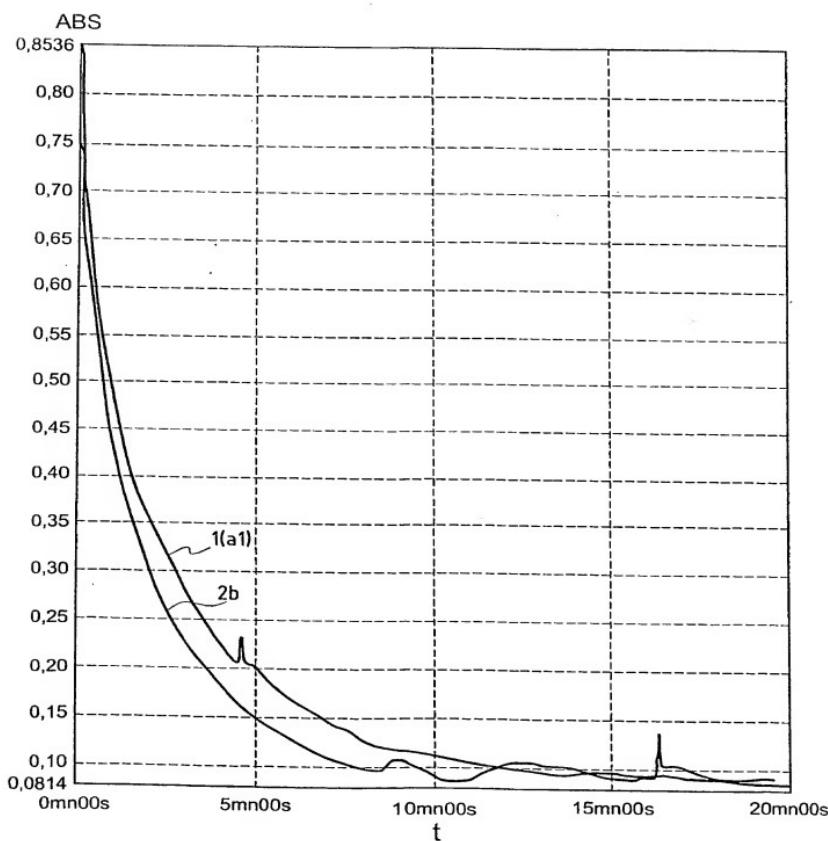


FIG.2

3/3

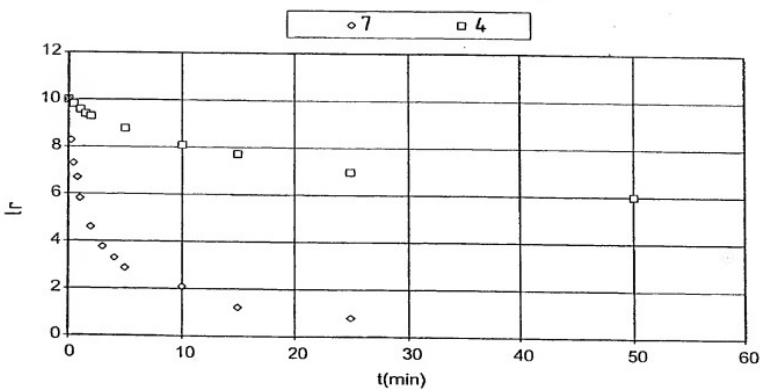


FIG.3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/01884A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 46839 A (GRYCZYNSKI IGNACY ; LAKOWICZ JOSEPH R (US); UNIV MARYLAND (US); GRY) 10 August 2000 (2000-08-10) abstract ----	1-30
A	WO 91 09141 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 27 June 1991 (1991-06-27) cited in the application example 39 ----	1-30
A	WO 99 62079 A (MARGEL SHLOMO ;UNIV BAR ILAN (IL); GURA SIGALIT (IL)) 2 December 1999 (1999-12-02) claim 32; example 10 ----	1-30 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention can be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *B* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 6 November 2003	Date of mailing of the international search report 14/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5616 Palentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/01884

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 98765 A (CHAU WO CHIU ;PODUAL KAIRALI (US); XIANG LI ALICE (US); BANERJEE S) 27 December 2001 (2001-12-27) claim 31 ----	1-30
A	ROBERTS D ET AL: "SYNTHESIS OF GADOLINIUM OXIDE MAGNETOLIPOSOMES FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING" JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, vol. 87, no. 9, 1 May 2000 (2000-05-01), pages 6208-6210, XP000953964 ISSN: 0021-8979 the whole document	1-30
A	SANGREGORIO C ET AL: "A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF MAGNETOLIPOSOMES" JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, vol. 85, no. 8, 15 April 1999 (1999-04-15), pages 5699-5701, XP000902189 ISSN: 0021-8979 the whole document	1-30
A	US 2001/046602 A1 (CHANDLER DON J ET AL) 29 November 2001 (2001-11-29) the whole document	1-30
A	KERN N ET AL: "Vesicles decorated with magnetic particles" EUROPHYSICS LETTERS, 10 MAY 1997, EUR. PHYS. SOC. SWITZERLAND, vol. 38, no. 5, pages 395-400, XP008015610 ISSN: 0295-5075 the whole document	1-30
A	WO 98 08094 A (AMCELL CORP) 26 February 1998 (1998-02-26) claim 7; example 1 ----	1-30
A	WO 00 43783 A (BAMDAD R SHOSHANA ;BAMDAD CYNTHIA CAROL (US); MINERVA BIOTECHNOLOG) 27 July 2000 (2000-07-27) figures 9,27 ----	1-30
A	WO 02 18643 A (NANOSPHERE INC) 7 March 2002 (2002-03-07) page 82, paragraph 2 -page 85, paragraph 1; claim 92; figures 24,48 ----	1-30
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR 03/01884

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 73117 A (MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RES ;SCHEFFOLD ALEXANDER (DE); BOSIO AND) 4 October 2001 (2001-10-04) page 2, paragraph 5 page 3, paragraph 3 -----	1-30

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR 03/01884

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0046839	A 10-08-2000	AU 4324900 A EP 1161490 A2 JP 2002536285 T WO 0046839 A2		25-08-2000 12-12-2001 29-10-2002 10-08-2000
WO 9109141	A 27-06-1991	US 5283079 A AT 148746 T AU 634631 B2 AU 7174691 A CA 2046894 A1 DE 69029908 D1 DE 69029908 T2 DK 463144 T3 EP 0463144 A1 ES 2099156 T3 JP 2762259 B2 JP 9028397 A JP 2589618 B2 JP 4503968 T WO 9109141 A1 US 6013531 A US 5395688 A		01-02-1994 15-02-1997 25-02-1993 18-07-1991 15-06-1991 20-03-1997 22-05-1997 10-03-1997 02-01-1992 16-05-1997 04-06-1998 04-02-1997 12-03-1997 16-07-1992 27-06-1991 11-01-2000 07-03-1995
WO 9962079	A 02-12-1999	AT 243882 T AU 4161399 A DE 69909090 D1 EP 1088315 A1 WO 9962079 A1 JP 2002517085 T		15-07-2003 13-12-1999 31-07-2003 04-04-2001 02-12-1999 11-06-2002
WO 0198765	A 27-12-2001	AU 7299301 A CA 2413978 A1 EP 1311839 A1 WO 0198765 A1		02-01-2002 27-12-2001 21-05-2003 27-12-2001
US 2001046602	A1 29-11-2001	AU 4989501 A WO 0178087 A2		23-10-2001 18-10-2001
WO 9808094	A 26-02-1998	AU 3886697 A CA 2234582 A1 EP 0882232 A1 WO 9808094 A1		06-03-1998 26-02-1998 09-12-1998 26-02-1998
WO 0043783	A 27-07-2000	AU 3347900 A CA 2360927 A1 EP 1147416 A2 JP 2002535656 T WO 0043783 A2		07-08-2000 27-07-2000 24-10-2001 22-10-2002 27-07-2000
WO 0218643	A 07-03-2002	US 2002155442 A1 US 2003022169 A1 AU 8124801 A CA 2418502 A1 US 2003087242 A1 WO 0218643 A2 US 2002172953 A1 AU 3059302 A AU 5520301 A		24-10-2002 30-01-2003 13-03-2002 07-03-2002 08-05-2003 07-03-2002 21-11-2002 18-06-2002 08-10-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR 03/01884

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0218643	A		CA 2402955 A1 EP 1301625 A2 EP 1356109 A2 WO 0173123 A2 WO 0246472 A2 AU 3279501 A CA 2396113 A1 EP 1294930 A2 WO 0151665 A2 WO 02079490 A2 US 2002192687 A1	04-10-2001 16-04-2003 29-10-2003 04-10-2001 13-06-2002 24-07-2001 19-07-2001 26-03-2003 19-07-2001 10-10-2002 19-12-2002
WO 0173117	A	04-10-2001	AU 5624401 A WO 0173117 A1 EP 1268858 A1 JP 2003528625 T US 2003077636 A1	08-10-2001 04-10-2001 02-01-2003 30-09-2003 24-04-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°
PCT/FR 03/01884

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/533

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents intègrent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 00 46839 A (GRYCZYNSKI IGNACY ; LAKOWICZ JOSEPH R (US); UNIV MARYLAND (US); GRY) 10 août 2000 (2000-08-10) abrégié ---	1-30
A	WO 91 09141 A (BAXTER DIAGNOSTICS INC) 27 juin 1991 (1991-06-27) cité dans la demande exemple 39 ---	1-30
A	WO 99 62079 A (MARGEL SHLOMO ; UNIV BAR ILAN (IL); GURA SIGALIT (IL)) 2 décembre 1999 (1999-12-02) revendication 32; exemple 10 ---	1-30
-/--		

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document destiné à jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document public avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'apportant pas à l'état de la technique plus de nouveauté, mais cité pour illustrer le principe ou la théorie constitutif la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 novembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14/11/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patenttaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gunster, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/01884

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents.	no. des revendications visées
A	WO 01 98765 A (CHAU WO CHIU ;PODUAL KAIRALI (US); XIANG LI ALICE (US); BANERJEE S) 27 décembre 2001 (2001-12-27) revendication 31 ----	1-30
A	ROBERTS D ET AL: "SYNTHESIS OF GADOLINIUM OXIDE MAGNETOLIPOSOMES FOR MAGNETIC RESONANCE IMAGING" JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, vol. 87, no. 9, 1 mai 2000 (2000-05-01), pages 6208-6210, XP000953964 ISSN: 0021-8979 le document en entier ----	1-30
A	SANGREGORIO C ET AL: "A NEW METHOD FOR THE SYNTHESIS OF MAGNETOLIPOSOMES" JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, AMERICAN INSTITUTE OF PHYSICS. NEW YORK, US, vol. 85, no. 8, 15 avril 1999 (1999-04-15), pages 5699-5701, XP000902189 ISSN: 0021-8979 le document en entier ----	1-30
A	US 2001/046602 A1 (CHANDLER DON J ET AL) 29 novembre 2001 (2001-11-29) le document en entier ----	1-30
A	KERN N ET AL: "Vesicles decorated with magnetic particles" EUROPHYSICS LETTERS, 10 MAY 1997, EUR. PHYS. SOC. SWITZERLAND, vol. 38, no. 5, pages 395-400, XP008015610 ISSN: 0295-5075 le document en entier ----	1-30
A	WO 98 08094 A (AMCELL CORP) 26 février 1998 (1998-02-26) revendication 7; exemple 1 ----	1-30
A	WO 00 43783 A (BAMDAD R SHOSHANA ;BAMDAD CYNTHIA CAROL (US); MINERVA BIOTECHNOLOG) 27 juillet 2000 (2000-07-27) figures 9,27 ----	1-30
A	WO 02 18643 A (NANOSPHERE INC) 7 mars 2002 (2002-03-07) page 82, alinéa 2 -page 85, alinéa 1; revendication 92; figures 24,48 ----	1-30
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No
PCT/FR 03/01884

C (suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01 73117 A (MEMOREC MEDICAL MOLECULAR RES ;SCHEFFOLD ALEXANDER (DE); BOSIO AND) 4 octobre 2001 (2001-10-04) page 2, alinéa 5 page 3, alinéa 3 -----	1-30

Formulaire PCT/ISA210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 03/01884

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0046839	A 10-08-2000	AU 4324900 A EP 1161490 A2 JP 2002536285 T WO 0046839 A2	25-08-2000 12-12-2001 29-10-2002 10-08-2000
WO 9109141	A 27-06-1991	US 5283079 A AT 148746 T AU 634631 B2 AU 7174691 A CA 2046894 A1 DE 69029908 D1 DE 69029908 T2 DK 463144 T3 EP 0463144 A1 ES 2099156 T3 JP 2762259 B2 JP 9028397 A JP 2589618 B2 JP 4503968 T WO 9109141 A1 US 6013531 A US 5395688 A	01-02-1994 15-02-1997 25-02-1993 18-07-1991 15-06-1991 20-03-1997 22-05-1997 10-03-1997 02-01-1992 16-05-1997 04-06-1998 04-02-1997 12-03-1997 16-07-1992 27-06-1991 11-01-2000 07-03-1995
WO 9962079	A 02-12-1999	AT 243882 T AU 4161399 A DE 69909090 D1 EP 1088315 A1 WO 9962079 A1 JP 2002517085 T	15-07-2003 13-12-1999 31-07-2003 04-04-2001 02-12-1999 11-06-2002
WO 0198765	A 27-12-2001	AU 7299301 A CA 2413978 A1 EP 1311839 A1 WO 0198765 A1	02-01-2002 27-12-2001 21-05-2003 27-12-2001
US 2001046602	A1 29-11-2001	AU 4989501 A WO 0178087 A2	23-10-2001 18-10-2001
WO 9808094	A 26-02-1998	AU 3886697 A CA 2234582 A1 EP 0882232 A1 WO 9808094 A1	06-03-1998 26-02-1998 09-12-1998 26-02-1998
WO 0043783	A 27-07-2000	AU 3347900 A CA 2360927 A1 EP 1147416 A2 JP 2002535656 T WO 0043783 A2	07-08-2000 27-07-2000 24-10-2001 22-10-2002 27-07-2000
WO 0218643	A 07-03-2002	US 2002155442 A1 US 2003022169-A1 AU 8124801 A CA 2418502 A1 US 2003087242 A1 WO 0218643 A2 US 2002172953 A1 AU 3059302 A AU 5520301 A	24-10-2002 30-01-2003 13-03-2002 07-03-2002 08-05-2003 07-03-2002 21-11-2002 18-06-2002 08-10-2001

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ANNEXE FAMILLES DE BREVETS DES DOCUMENTS DE BREVET

Demande Internationale No
PCT/FR 03/01884

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0218643	A	CA 2402955 A1 EP 1301625 A2 EP 1356109 A2 WO 0173123 A2 WO 0246472 A2 AU 3279501 A CA 2396113 A1 EP 1294930 A2 WO 0151665 A2 WO 02079490 A2 US 2002192687 A1	04-10-2001 16-04-2003 29-10-2003 04-10-2001 13-06-2002 24-07-2001 19-07-2001 26-03-2003 19-07-2001 10-10-2002 19-12-2002
WO 0173117	A 04-10-2001	AU 5624401 A WO 0173117 A1 EP 1268858 A1 JP 2003528625 T US 2003077636 A1	08-10-2001 04-10-2001 02-01-2003 30-09-2003 24-04-2003